



**Ciencia Latina**  
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.  
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), noviembre-diciembre 2024,  
Volumen 8, Número 6.

[https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v8i6](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i6)

# **LA CURCUMINA RESTABLECE LOS NIVELES DE P53 EN CÉLULAS DERIVADAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO EN UN MODELO IN VITRO E IN VIVO**

**CURCUMIN RESTORES P53 LEVELS IN CERVICAL  
CANCER-DERIVED CELLS IN AN IN VITRO AND  
IN VIVO MODEL**

**Vianey Berenice Rodríguez Donat**

Instituto Politécnico Nacional, México

**Carlos César Patiño Morales**

Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

**Ricardo Jaime Cruz**

Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

**Villavicencio Guzmán Laura**

Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

**Marcela Salzar García**

Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

DOI: [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v8i6.15199](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i6.15199)

## La Curcumina Restablece los Niveles de p53 en Células Derivadas de Cáncer Cervicouterino en un Modelo In Vitro e In Vivo

**Vianey Berenice Rodríguez Donat**<sup>1</sup>[vrzdonat@gmail.com](mailto:vrzdonat@gmail.com)<https://orcid.org/0009-0007-4663-9757>

Instituto Politécnico Nacional

México

**Carlos César Patiño Morales**[carloscesarpmorales@gmail.com](mailto:carloscesarpmorales@gmail.com)<https://orcid.org/0000-0003-1995-0308>

Hospital Infantil de México Federico Gómez

México

**Ricardo Jaime Cruz**[ricardo.jaime.cruz@gmail.com](mailto:ricardo.jaime.cruz@gmail.com)<https://orcid.org/0000-0002-0403-537X>

Hospital Infantil de México Federico Gómez

México

**Laura Villavicencio Guzmán**[lauvillavi@gmail.com](mailto:lauvillavi@gmail.com)<https://orcid.org/0000-0002-8314-8996>

Hospital Infantil de México Federico Gómez

México

**Marcela Salzar García**[msalazar@himfg.edu.mx](mailto:msalazar@himfg.edu.mx)<https://orcid.org/0000-0001-5318-8148>

Hospital Infantil de México Federico Gómez

México

### RESUMEN

La curcumina es un fitoquímico natural con propiedades antineoplásicas, incluida la modulación de p53. Se ha sugerido que apuntar a la actividad de p53 es una estrategia importante en la terapia contra el cáncer. El propósito de este estudio fue describir el efecto de curcumina sobre p53 en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino y en tumores inducidos in ovo. Se expusieron células HeLa y SiHa a curcumina. Se realizó evaluación de la viabilidad celular por MTT y TUNEL y se cuantificó la expresión de p53 mediante western blot, los resultados indican un efecto importante en la disminución de la viabilidad de las células que recibieron tratamiento y que hay un incremento de los niveles de p53, además aquí demostramos mediante ensayos de pulso y casa que la curcumina aumenta la vida media de p53. En muestras obtenidas de tumores inducidos in ovo también se observó un aumento en los niveles de p53 por inmunohistoquímica. El efecto citotóxico de la curcumina en las células de cáncer de cuello uterino se relacionó también con la activación de la vía Keap1/Nrf2. Nuestros hallazgos sugieren que el uso de curcumina puede reactivar la vía p53 en células cancerosas con p53 de tipo silvestre.

**Palabras clave:** curcumina, cáncer, p53, CaCu

---

<sup>1</sup> Autor principal

Correspondencia: [msalazar@himfg.edu.mx](mailto:msalazar@himfg.edu.mx)

# Curcumin Restores p53 Levels in Cervical Cancer-Derived Cells in an In Vitro and in Vivo Model

## ABSTRACT

Curcumin is a natural phytochemical with antineoplastic properties, including modulation of p53. It has been suggested that targeting p53 activity is an important strategy in cancer therapy. The purpose of this study was to describe the effect of curcumin on p53 in cervical cancer-derived cell lines and in ovo-induced tumors. HeLa and SiHa cells were exposed to curcumin. Cell viability assessment was performed by MTT and TUNEL and p53 expression was quantified by western blot, the results indicate a significant effect in decreasing the viability of the cells that received treatment and that there is an increase in p53 levels, furthermore here we demonstrate by pulse and house assays that curcumin increases the half-life of p53. In samples obtained from in ovo induced tumors we also observed an increase in p53 levels by immunohistochemistry. The cytotoxic effect of curcumin on cervical cancer cells was also associated with activation of the Keap1/Nrf2 pathway. Our findings suggest that the use of curcumin can reactivate the p53 pathway in cancer cells with wild-type p53.

**Keywords:** curcumin, cancer, p53, cervical cancer

*Artículo recibido 10 octubre 2024*

*Aceptado para publicación: 15 noviembre 2024*



## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo diverso de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento anormal de células y representa un importante problema mundial. Por ello, la búsqueda de alternativas terapéuticas contra las células tumorales ha sido un gran reto que ha llamado la atención e interés científico y comercial en el descubrimiento de fármacos anticancerígenos potentes, seguros y selectivos (Andreani et al., 2024; Matsuo, 2023; Pandey & Rizvi, 2009). Entre ellos, los antioxidantes son moléculas con potencial terapéutico ya que tienen la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno pero también se les han atribuido propiedades antitumorales (Chikara et al., 2018; Hecht et al., 2024; Houghton et al., 2016). Un ejemplo de estos compuestos naturales con este potencial es la curcumina, obtenida de las raíces de la planta *Curcuma longa*. Estructuralmente la curcumina es una molécula con regiones polares centrales y flanqueantes separadas por un segmento lipofílico de metionina. Además, tiene propiedades químicas distintivas, entre estas la presencia de compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados (aceptores de Michael) que facilitan las interacciones intermoleculares (Heger et al., 2014; Kasi et al., 2016; Slika & Patra, 2020). Las actividades antitumorales de la curcumina han sido demostradas por algunos grupos de investigación (Devassy et al., 2015; Goel et al., 2008; Hu et al., 2024; Yuan et al., 2023). Se ha demostrado que puede activar inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, por lo tanto reprime el crecimiento de numerosas líneas de células cancerosas por la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/Akt), Ras y vías de  $\beta$ -catenina (Mishra & Das, 2015). La curcumina también es un poderoso antioxidante porque activa la vía Keap1/Nrf2 en microambientes oxidantes (Prasad et al., 2014; Serafini et al., 2019). La vía Nrf2 está regulada por Keap1 al mediar su degradación, pero cuando las células están expuestas a electrófilos u oxidantes, Nrf2 se estabiliza y se transloca al núcleo, uniéndose al elemento de respuesta antioxidante (ARE) ubicado en la región promotora de genes antioxidantes y regula positivamente su transcripción. Nrf2 funciona como un factor de transcripción que promueve la expresión de enzimas antioxidantes como la NAD quinona oxidoreductasa 1 (Adinolfi et al., 2023; Baird & Yamamoto, 2020; Richardson et al., 2015; Theodore et al., 2008). Esta proteína tiene múltiples funciones, incluyendo la neutralización de especies reactivas de oxígeno, la desintoxicación de quinonas y la estabilización de proteínas por ejemplo; hay un informe que muestra que NQO1 puede interactuar con p53 causando su estabilización y por lo tanto la activación de la vía Keap1/Nrf2 podría implicar la



estabilización de p53 (Asher et al., 2002; Patiño-Morales et al., 2020; Stefanson & Bakovic, 2014).

La proteína p53 es un producto de un gen supresor de tumores que puede bloquear la progresión del ciclo celular cuando el ácido desoxirribonucleico (ADN) está dañado (Y. Liu et al., 2024; Sullivan et al., 2012). Se localiza en el núcleo, donde funciona como factor de transcripción de secuencias de ADN específicas en genes como p21. La activación de p53 puede activar diferentes vías que resultan en apoptosis, detención del ciclo celular, reparación del ADN o senescencia (Blattner, 2008; Engeland, 2022). Debido a su importancia biológica, las mutaciones en el gen supresor de tumores TP53 se observan en más del 50% de todos los cánceres humanos, sin embargo, hay tumores que presentan p53 de tipo silvestre como en el cáncer cervicouterino y por lo tanto se vuelve un potencial blanco terapéutico. (Hassin & Oren, 2023; Leroy et al., 2014). En este trabajo investigamos el incremento en los niveles y la estabilidad de p53 mediados por la curcumina. Demostramos que la curcumina no solo promueve el incremento de los niveles de p53 en líneas celulares y tumores inducidos *in ovo*, sino que además la curcumina es necesaria para estabilizar p53. Este compuesto natural podría tener un gran potencial como coadyuvante a la terapia convencional del cáncer en tumores con p53 de tipo silvestre.

## **METODOLOGÍA**

### **Sustancias químicas y reactivos**

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma Aldrich CAS57360-69-7), curcumina (Sigma Aldrich C1386), Dulbecco's Modified, Eagle medio alto en glucosa (DMEM 11965–084), suero fetal bovino (Gibco10500056), verseno (Gibco 15040066), azul tripano (Sigma Aldrich CAS72-57-1), recuperador de antígenos Diva Decloaker 10x (BioCare Medical SKU:DV2004), bloqueador universal de proteínas libre de suero (Dako X0909), DAB cromógeno + DAB amortiguador de sustrato (Dako GV825). Anticuerpo monoclonal de ratón anti-p53 Pab 1801 (sc-98), anti-GAPDH (sc-13179) anti-Lámina A/C (sc-7293), anticuerpo monoclonal anti-ratón m-IgG k BP-HRP (sc-516102). PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific 26616), cóctel inhibidor de proteasa comprimidos sin EDTA (Sigma Aldrich s8830), parafina (Tissue-Tek VIP), kit NE-PERTM Nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Fisher Scientific Cat. No. 78835), kit de TUNEL (CAT ab206386, Abcam), vectashield (Vector Laboratories CAT11887), paraformaldehído (Santa Cruz Biotechnology CAS89277-65-6), DMSO (Santa Cruz Biotechnology CAS67-68-5), Tris (Sigma Aldrich



CAS 77-86-1), NaCl (Sigma Aldrich CAS 7647-14-5), fosfato de sodio (Sigma Aldrich CAS 10049-21-5), Cicloheximida (Sigma Aldrich CAS 66-81-9), Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific CAT23227), solución de peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich CAS7722-84-1).

#### Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares HeLa y SiHa fueron adquiridas de la American Type Culture Collection y se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. A los cultivos celulares se les dio tratamiento con curcumina a concentraciones de 10 µM y 20 µM durante 24 horas, después de la incubación se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados de 5 minutos y las células se fijaron con paraformaldehído durante 15 minutos posteriormente se observaron en un microscopio de campo claro para evaluar los cambios morfológicos postratamiento.

#### Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Se sembraron las células HeLa y SiHa (5000 células/pozo) en una placa de 96 pozos, se trataron con curcumina 10 µM y 20 µM y se incubaron a 37°C durante 24 h. Después del tiempo de incubación se retiró el medio y se agregaron 10 µl por pozo de solución de MTT (5 mg/ml), las células se incubaron a 37 °C durante 4 horas y los cristales de formazán se disolvieron utilizando 50 µl de DMSO. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas multimodo híbrido Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA).

#### Fraccionamiento celular

Para la detección de Nrf2 en el núcleo el fraccionamiento celular se realizó según el protocolo del kit NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents. Los cultivos celulares de ambas líneas se trataron con curcumina 10 µM y 20 µM, se lavaron con PBS y se colectaron 1x10<sup>6</sup> células por cada condición evaluada (control y experimental) que se resuspendieron en tampón CER I. Las células se agitaron vigorosamente y luego se añadió tampón CER II. Las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y almacenó como extracto citoplasmático. El sedimento se resuspendió en tampón NER y se agitó vigorosamente cada 10 min durante 40 min.



Finalmente, las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recuperó y almacenó como extracto nuclear.

### **TUNEL**

Las células SiHa y HeLa fueron sembradas en cubreobjetos y tratadas con curcumina (10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M) durante 24 horas posteriormente se fijaron en formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS 1X a pH 7.2. La apoptosis de las células se detectó utilizando un kit de TUNEL de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje Vectashield® que contenía 50  $\mu$ g/ml de DAPI para marcaje nuclear durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células TUNEL positivas presentan núcleos verdes cuando se visualizan bajo un microscopio de fluorescencia.

### **Western blot**

Los lisados de las muestras de células se extrajeron con un buffer de lisis compuesto por Tris 50 mM, pH 7.6, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1 %, fosfato de sodio 10 mM y un cóctel inhibidor de proteasa en tableta completa por 100 ml de tampón. La concentración en los lisados se cuantificó utilizando un kit de de ácido bicinconínico en el cual se utiliza albúmina sérica bovina como estándar. Se sometieron cantidades iguales de proteína total a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10 % (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, seguido de incubación durante la noche a 4 °C utilizando la siguiente dilución de anticuerpos primarios: anti-p53 (1: 100), anti-lamina A/C (1:500), anti-GAPDH (1:1000), seguido de incubación con anticuerpo secundario acoplado a HRP en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, se utilizó la siguiente dilución: anti-ratón (1:1000). Finalmente los niveles de expresión de proteínas se visualizaron con un escáner que detecta la quimioluminiscencia Li-COR C-DiGit

### **Ensayo de pulso y caza**

Las células se sembraron en placas p35 a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/placa y se trataron con curcumina a una concentración de 20  $\mu$ M durante 24 h, se eliminó el medio que contenía el tratamiento y las células se lavaron con PBS, continuando con el tratamiento con CHX en una concentración de 50  $\mu$ g/ml como ha sido reportado anteriormente (Hochstrasser, 1995; Yewdell et al., 2011), (la CHX es un inhibidor de la síntesis de proteínas) se colectaron alícuotas de células cada diez minutos a partir de

0 min, 10 min, 20 min, y así sucesivamente hasta completar 60 min inmediatamente después de la adición del compuesto, las células se lisaron con el buffer de lisis descrito previamente, se analizó la abundancia de proteína p53 en cada momento mediante western blot.

### **Inducción de tumores *in ovo***

Se obtuvieron huevos fecundados de gallina de una granja local (ALPES, Puebla, México) y se incubaron con volteo automático a 37.8°C a humedad relativa del 80% durante 8 días. Los cascarones del huevo fueron desinfectados con alcohol al 70% y se les abrió una ventana circular en el cascarón de 2cm de diámetro, seguido del retiro de la membrana testácea, dejando expuesta la membrana coriolanatoidea (CAM). Las células que se colocaron en la CAM se procesaron de la siguiente manera; cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 70% se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS y posteriormente se agregó una solución 1:1 de verceno y tripsina para desprender las células de la caja y se incubaron a 37°C durante 10 minutos, pasado el tiempo se inhibió la actividad de la tripsina con medio suplementado con suero fetal bovino, se colocó la suspensión en tubos Eppendorf, se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en PBS, las células se contaron por el método de exclusión con azul tripano, utilizando una cámara de Neubauer. Se tomó la cantidad necesaria para reunir  $3 \times 10^6$  células y se resuspendieron en matrigel esta suspensión de células en matrigel se colocaron en la CAM de embrión pollo previa leve laceración de la CAM. Se cubrió la ventana con cinta adhesiva y se incubó a 37.8°C en incubadora estática durante 4 días. Se prepararon dos soluciones de curcumina a 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ . Se colocó un volumen de 100 microlitros de solución en cada tumor inducido en la CAM de embrión de pollo, se incubaron por 2 días a 37.8°C en incubadora en condiciones estáticas. Pasado el tiempo de tratamiento, los tumores dentro del huevo fueron fotografiados para posteriormente hacer la resección y fijarlos en paraformaldehído (al 4% en PBS pH 7.2) durante 24 horas, por último se retiró el paraformaldehído y los tumores se colocaron en PBS pH 7.2.

### **Técnica histológica**

Los tumores fijados fueron deshidratados a través de una serie de alcoholes (30-100%), se sumergieron en xileno y se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 5 $\mu\text{m}$  y se montaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina para su posterior análisis.



### **Inmunohistoquímica**

La expresión de los niveles de proteína fueron estimados por inmunohistoquímica usando un anticuerpo primario contra p53(1:100). Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario a lo largo de la noche a 4°C para al día siguiente ser tratados con el anticuerpo secundario anti mouse-HRP (1:200). Las muestras fueron tratadas con Diaminobencidina (DAB). Posteriormente se realizó una contratinción nuclear con hematoxilina de Harris. Finalmente, las muestras fueron montadas y vistas en el microscopio (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany).

### **Diseño y tipo de estudio**

Por el empleo de los sujetos de estudio y captación de la información: Experimental y prospectivo, por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal, por la presencia de un grupo control: Comparativo. Criterios de inclusión: Embriones de pollo de 8 días de incubación con inducción efectiva de tumores en la membrana corioalantoidea (MCA).

Criterios de exclusión y eliminación: Las muestras con concentraciones bajas de proteínas y embriones de pollo con malformaciones congénitas.

### **Análisis estadístico**

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se utilizó el software JAMOVI para el análisis y las gráficas. Se realizó la prueba de Shapiro Wilk para normalidad, prueba de Levene para homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor junto con la prueba Post Hoc de Tukey. También se utilizó la prueba t de estudent para realizar la comparación de dos grupo. Una  $p < 0.05$  se tomó como estadísticamente significativa.

### **Consideraciones éticas y de bioseguridad:**

El trabajo realizado con animales cumplió con lo establecido en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud vigente. El manejo del modelo animal (embriones de pollo) se llevó a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (8va edición, 2017) y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio. Se cumplió con lo que estipula la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Protección ambiental - Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo). La clasificación y manejo de los desechos CRETI que se generaron se realizó de acuerdo a lo que dicta la

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 (que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de residuos peligrosos).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **La curcumina tiene un efecto importante sobre la viabilidad celular**

Existen reportes que hacen referencia a los efectos benéficos de la curcumina en la salud (Liu et al., 2022), entre ellos su efecto antitumorales en diferentes tipos de cánceres (Alhasawi et al., 2022). Para evaluar el efecto de la curcumina sobre la viabilidad celular se realizó un ensayo MTT. El tratamiento con curcumina induce una disminución significativa en la viabilidad celular de una manera dosis dependiente tanto en la línea celular SiHa (Figura 1 A) como en la línea celular HeLa (Figura 1 B). Se determinó que la dosis de 20  $\mu\text{M}$  es la mejor para dar tratamiento a las células porque no ocasiona muerte total de los cultivos y por lo tanto permite realizar ensayos posteriores, a partir de la dosis de 40  $\mu\text{M}$  en adelante se observan muchas células muertas y el material obtenido no alcanza para realizar otros experimentos. Se evaluaron los cambios morfológicos en las células después del tratamiento con curcumina y se observaron características propias de la muerte celular, como pérdida de la adhesión, pérdida de comunicación célula-célula y aparición de cuerpos apoptóticos (Figura 2 A-B). Para confirmar la muerte celular por apoptosis se realizó el ensayo de TUNEL en las células tratadas como se describe anteriormente. El tratamiento con curcumina provoca que las células sean positivas a TUNEL (indicativo de apoptosis) en comparación con los controles sin tratamiento tanto en células SiHa (figura 3 A-F) como en células HeLa (Figura 3 G-L). Los resultados corresponden con otros trabajos previamente reportados en donde se demuestra el efecto antitumoral de la curcumina *in vitro* en células provenientes de diferentes tumores (Rainey et al., 2020).

### **La curcumina incrementa los niveles y la vida media de p53**

Se realizó un western blot de proteínas extraídas a partir de células que fueron tratadas con curcumina y se observó que el tratamiento a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  aumenta los niveles de p53 (Figura 4 A). p53 desempeña un papel central en la protección del genoma y la prevención de la transformación celular (Lavin & Gueven, 2006). A pesar de que las mutaciones en el gen p53 ocurren en el 50% de los cánceres, las células de cáncer cervical retienen p53 de tipo silvestre y funcional (Srivastava et al., 1992). Por lo tanto, las líneas celulares cancerosas con p53 silvestre pueden reactivar las vías



desencadenantes de la muerte celular y disminuir la viabilidad celular (Goodwin & DiMaio, 2000). Por lo tanto, la restauración de p53 puede ser una estrategia terapéutica prometedora, sin embargo, la estabilidad de p53 es un factor importante para la vía de reactivación. Se ha reportado anteriormente que la vida media de p53 es de 20 minutos en condiciones fisiológicas (Sullivan et al., 2018) Para evaluar el efecto de la curcumina sobre la vida media de p53, analizamos su estabilidad después de tratamientos con curcumina o cicloheximida, un conocido inhibidor de la síntesis de proteínas (Buchanan et al., 2016). Se encontró que la estabilidad de p53 de las células HeLa y SiHa sin tratamiento con curcumina fue de 20 minutos, sin embargo, cuando las células se trataron con 20  $\mu$ M de curcumina, se detectó la proteína p53 hasta los 60 minutos (Figura 4B). Estos resultados sugieren que la curcumina puede mejorar la vida media de p53 de las células tumorales.

Estudios previos han demostrado que la curcumina es capaz de activar la vía Keap1/Nrf2 (Pulido-Moran et al., 2016). Previamente se ha demostrado que la activación de esta vía es necesaria para la estabilización de p53 (Patiño-Morales et al., 2020). Para determinar la participación de la curcumina en la activación de la vía Keap1/Nrf2 en nuestro modelo, evaluamos la translocación de Nrf2 al núcleo en líneas celulares de cáncer de cuello uterino HeLa y SiHa en respuesta al tratamiento con curcumina. Nuestros resultados confirman la inmunodetección de Nrf2 en el extracto nuclear después del tratamiento en una concentración de 20  $\mu$ M con curcumina (Figura 4C) un evento que indica la activación de la vía Keap1/Nrf2. En conjunto, estos resultados indican que la curcumina puede tener un papel importante en la activación de la vía p53 dependiente de la vía Keap1/Nrf2.

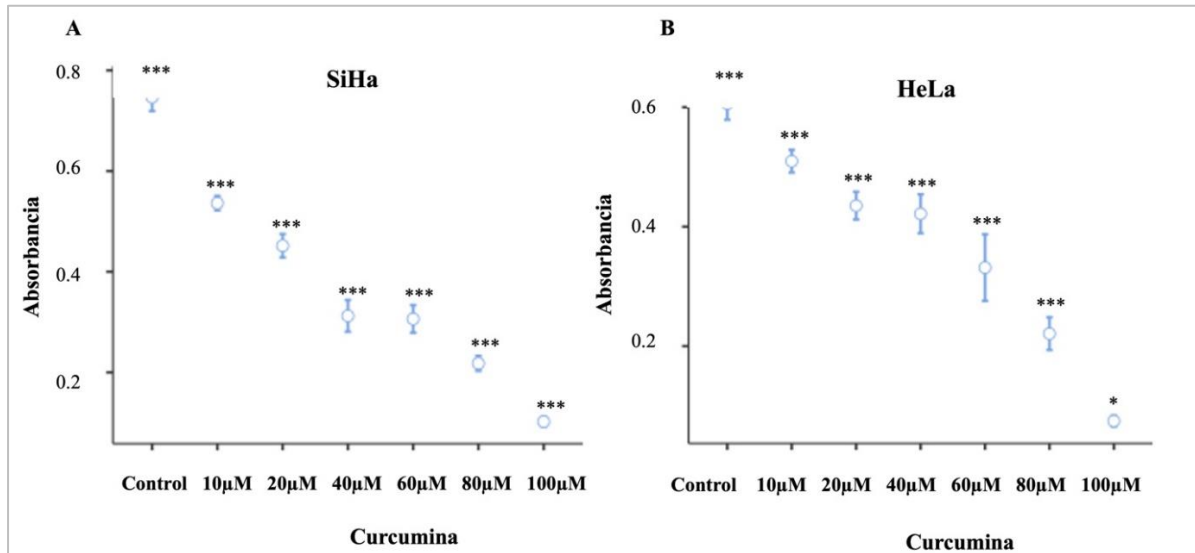
### **La curcumina disminuye el tamaño de tumores inducidos *in ovo* e incrementa p53 en tumores**

En orden de confirmar el efecto antitumoral de la curcumina visto previamente en el modelo *in vitro* se indujeron tumores en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, los cuales fueron tratados con curcumina. Se observa que la curcumina disminuye el tamaño de los tumores generados con ambas líneas celulares (Figura 5 A), además los tumores se retiraron para realizar la inmunodetección de p53 y se observó una mayor expresión de esta molécula en los tumores con tratamiento (++) comparados con los tumores sin tratamiento (+) (Figura 5B). El modelo *in ovo* puede ser un buen modelo para estudiar la biología del desarrollo de tumores (Schneider-Stock & Ribatti, 2021) pero hasta ahora no se había utilizado para evaluar el efecto de la curcumina en tumores inducidos con células que provienen de

cáncer cervicouterino. Los resultados concuerdan con otros reportados previamente en donde el tratamiento con curcumina disminuye el tamaño de tumores de diferentes tipos de cáncer pero en modelo de ratón (Bimonte et al., 2015; Luo et al., 2011; Yılmaz et al., 2019).

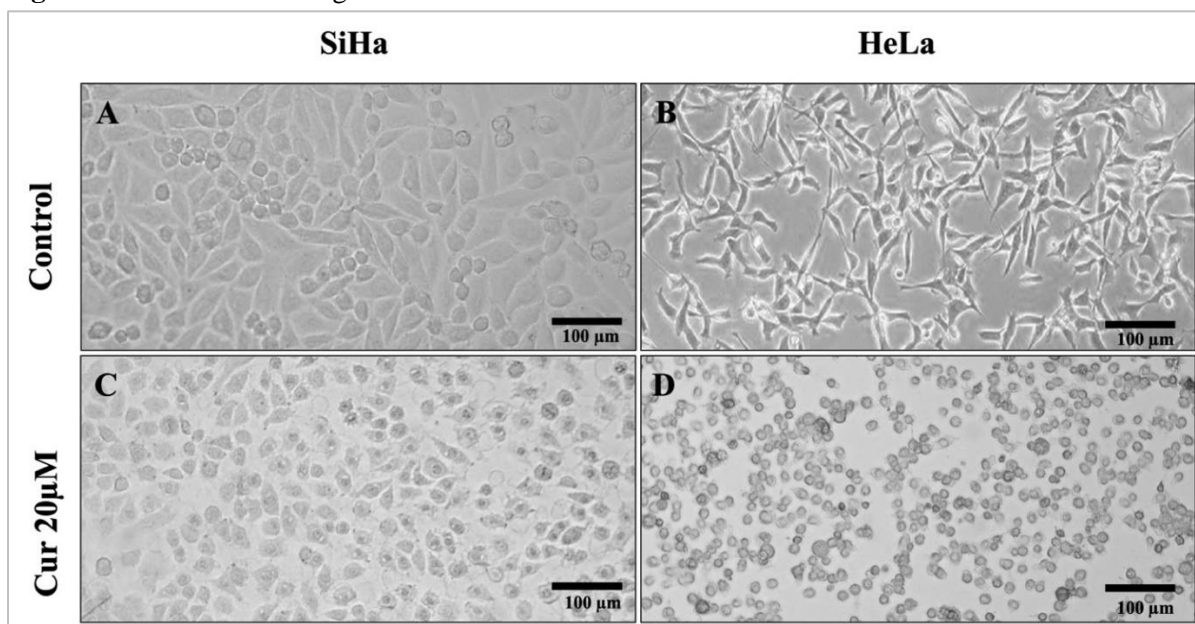
**ILUSTRACIONES, TABLAS, FIGURAS.**

**Figura 1.** Efecto de la curcumina en la viabilidad de células SiHa y HeLa.



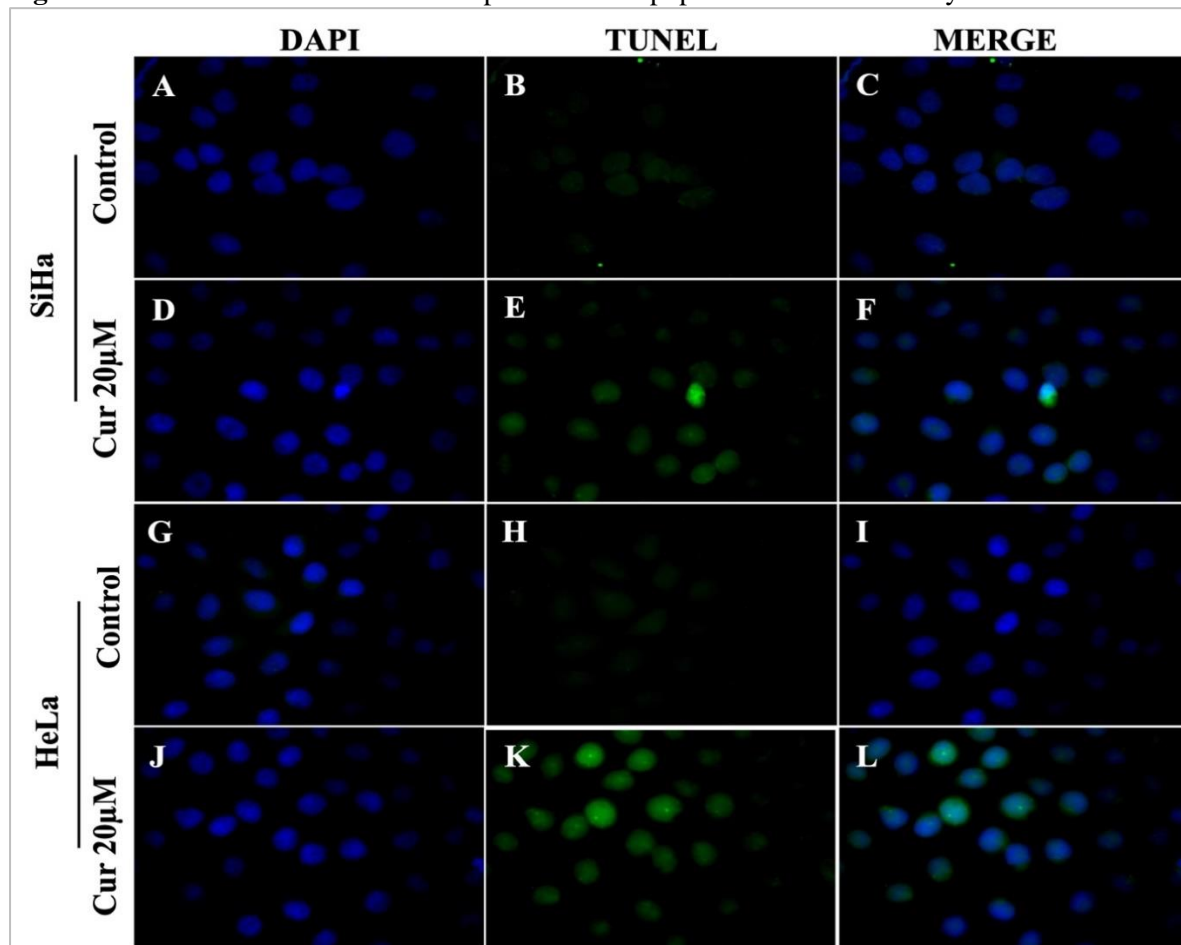
La viabilidad celular se evaluó utilizando MTT. Los valores se representan como medias ± DE de tres experimentos independientes. El control representa las células sin tratamiento. Las diferencias estadísticas en A y B se determinaron mediante ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey; (\*\*\*)  $p < 0,005$ .

**Figura 1.** Cambios morfológicos en células tratadas con curcumina



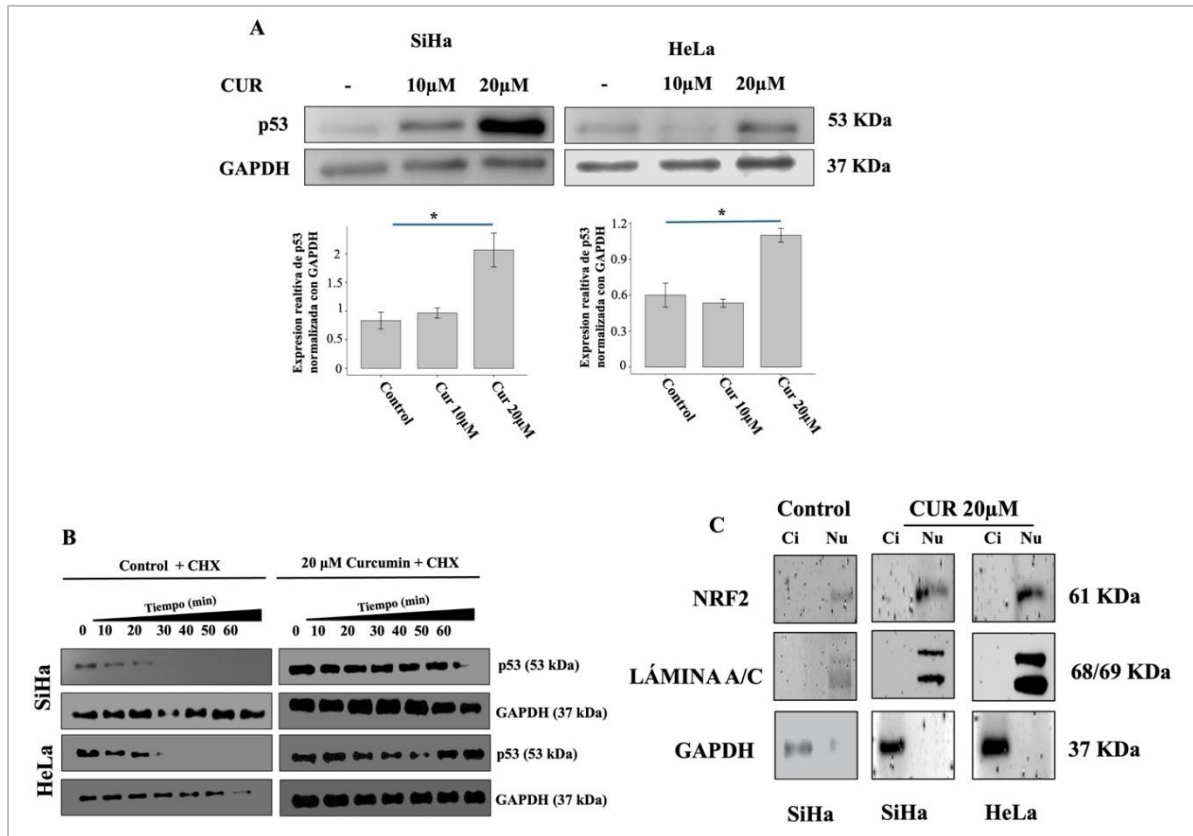
Las células del control, sin tratamiento (A y B) permanecen completamente adheridas y comunicadas entre ellas. Por el contrario, los cultivos expuestos al tratamiento (C y D) denotan cambios que hacen notables la toxicidad de la curcumina (20  $\mu$ M) ya que las células comienzan a perder adhesión y comunicación entre ellas, empiezan a circularizarse y se observa la presencia de cuerpos apoptóticos. “Cur” representa el tratamiento con curcumina

**Figura 2.** El tratamiento con curcumina promueve la apoptosis de células SiHa y HeLa.



(A-C) Control sin tratamiento de las células SiHa, (D-F) Células SiHa tratadas con 20 $\mu$ M de curcumina. (G-I) Control sin tratamiento de células HeLa, (J-L) Células HeLa tratadas con 20 $\mu$ M de curcumina (Cur).

**Figura 4.** La curcumina incrementa los niveles y la vida media de p53.

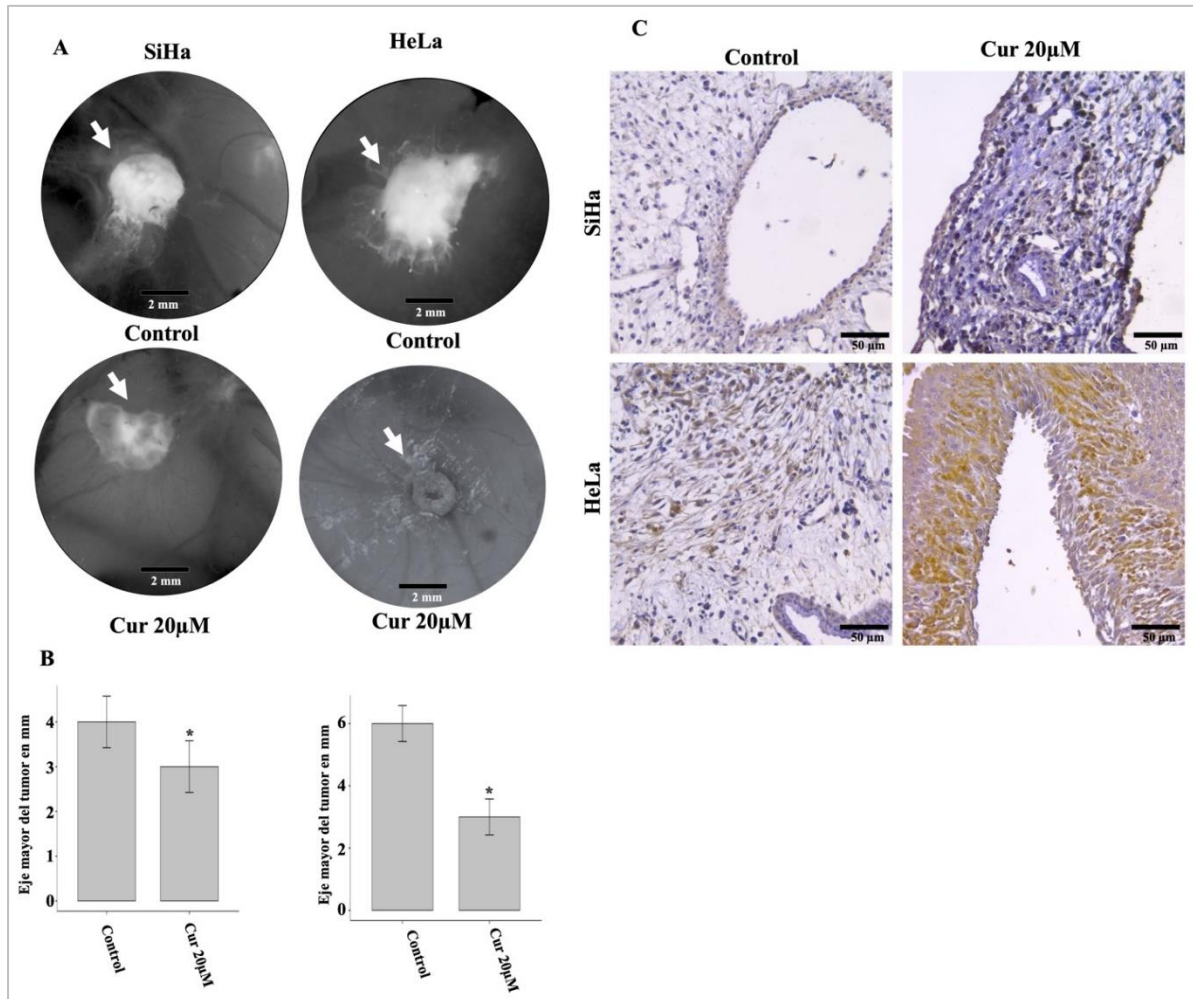


A) Se trataron células SiHa y HeLa con 10 μM y 20 μM de curcumina durante 24 h, el incremento de p53 se detectó mediante western blot. El signo negativo (-) representa las células sin tratamiento. Se utilizó la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey para establecer una diferencia significativa \*p<0.05

B) Se evaluó la vida media de p53 con un experimento de pulso y caza con cicloheximida (CHX) en una concentración de 50 μg/ml. La extracción de proteínas se realizó cada 10 minutos (0-60) y se reveló mediante inmunotransferencia, la estabilidad de p53 se evaluó en células control (sin curcumina) y células tratadas con curcumina.

C) Se evaluó la activación de la vía Keap1/Nrf2 por la translocación de Nrf2 al núcleo para ello las células HeLa y SiHa se trataron con 20 μM de curcumina se realizó el fraccionamiento celular y la extracción de proteínas de cada fracción Ci representa la fracción citoplasmática y Nu la fracción nuclear. “Cur” representa el tratamiento con curcumina.

**Figura 4.** Expresión de p53 en tumores inducidos *in ovo* tratados con curcumina.



A) Ambas líneas celulares se colocaron en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM) para generar tumores que fueron tratados con curcumina (20 $\mu$ M), el control representa a los tumores sin tratamiento, las flechas blancas señalan los tumores, la barra de escala representa 2 mm.

B) Se midió el eje mayor de los tumores. Se aplicó la prueba t de student para establecer la diferencia significativa entre los tumores control vs los que fueron tratados \*  $p < 0.05$ .

C) Secciones de tumores en los que se realizó la inmunodetección de p53. “Cur” representa el tratamiento con curcumina.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran la importancia de la curcumina como agente natural promotor de la muerte de células cancerosas, lo cual indica su posible potencial como agente antitumoral, además este trabajo destaca la importancia de este compuesto en la regulación de la expresión y de la estabilidad de p53. En nuestro trabajo, las líneas celulares derivadas de tumores HeLa, SiHa tienen p53 de tipo

silvestre y conservan la vía correspondiente intacta; por lo tanto, la curcumina puede ser un agente terapéutico potencial como coadyuvante en el tratamiento de tumores con p53 de tipo silvestre, sin embargo es necesario seguir realizando estudios para elucidar el mecanismo molecular de acción de la curcumina, así como la realización de estudios en los cuales se de tratamiento con antineoplásicos y curcumina en conjunto para poder evaluar su papel como coadyuvante terapéutico. Así mismo se requiere poder escalar los ensayos en modelos más complejos hasta poder llegar a hacer un estudio en pacientes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adinolfi, S., Patinen, T., Jawahar Deen, A., Pitkänen, S., Härkönen, J., Kansanen, E., Küblbeck, J., & Levonen, A.-L. (2023). The KEAP1-NRF2 pathway: Targets for therapy and role in cancer. *Redox Biology*, 63, 102726. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102726>
- Alhasawi, M. A. I., Aatif, M., Muteeb, G., Alam, M. W., Oirdi, M. E., & Farhan, M. (2022). Curcumin and Its Derivatives Induce Apoptosis in Human Cancer Cells by Mobilizing and Redox Cycling Genomic Copper Ions. *Molecules*, 27(21), 7410. <https://doi.org/10.3390/molecules27217410>
- Andreani, T., Cheng, R., Elbadri, K., Ferro, C., Menezes, T., Dos Santos, M. R., Pereira, C. M., & Santos, H. A. (2024). Natural compounds-based nanomedicines for cancer treatment: Future directions and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, 14(10), 2845–2916. <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01649-z>
- Asher, G., Lotem, J., Sachs, L., Kahana, C., & Shaul, Y. (2002). Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13125–13130. <https://doi.org/10.1073/pnas.202480499>
- Baird, L., & Yamamoto, M. (2020). The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40(13), e00099-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
- Bimonte, S., Barbieri, A., Palma, G., Rea, D., Luciano, A., D’Aiuto, M., Arra, C., & Izzo, F. (2015). Dissecting the Role of Curcumin in Tumour Growth and Angiogenesis in Mouse Model of Human Breast Cancer. *BioMed Research International*, 2015(1), 878134.





<https://doi.org/10.1155/2015/878134>

- Blattner, C. (2008). Regulation of p53: The next generation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(20), 3149–3153. <https://doi.org/10.4161/cc.7.20.6921>
- Buchanan, B. W., Lloyd, M. E., Engle, S. M., & Rubenstein, E. M. (2016). Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 110, 53975. <https://doi.org/10.3791/53975>
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.002>
- Devassy, J. G., Nwachukwu, I. D., & Jones, P. J. H. (2015). Curcumin and cancer: Barriers to obtaining a health claim. *Nutrition Reviews*, 73(3), 155–165. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu064>
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: P53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation*, 29(5), 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, 75(4), 787–809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>
- Goodwin, E. C., & DiMaio, D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12513–12518. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12513>
- Hassin, O., & Oren, M. (2023). Drugging p53 in cancer: One protein, many targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 22(2), 127–144. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8>
- Hecht, F., Zocchi, M., Alimohammadi, F., & Harris, I. S. (2024). Regulation of antioxidants in cancer. *Molecular Cell*, 84(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.11.001>
- Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., & Michel, M. C. (2014). The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 222–307. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004044>
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein



- degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(2), 215–223. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80031-x](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80031-x)
- Houghton, C. A., Fassett, R. G., & Coombes, J. S. (2016). Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 7857186. <https://doi.org/10.1155/2016/7857186>
- Hu, Y., Cheng, L., Du, S., Wang, K., & Liu, S. (2024). Antioxidant curcumin induces oxidative stress to kill tumor cells (Review). *Oncology Letters*, 27(2), 67. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.14200>
- Kasi, P. D., Tamilselvam, R., Skalicka-Woźniak, K., Nabavi, S. F., Daglia, M., Bishayee, A., Pazoki-Toroudi, H., & Nabavi, S. M. (2016). Molecular targets of curcumin for cancer therapy: An updated review. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13017–13028. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5183-y>
- Lavin, M. F., & Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death and Differentiation*, 13(6), 941–950. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401925>
- Leroy, B., Girard, L., Hollestelle, A., Minna, J. D., Gazdar, A. F., & Soussi, T. (2014). Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: A reassessment. *Human Mutation*, 35(6), 756–765. <https://doi.org/10.1002/humu.22556>
- Liu, S., Liu, J., He, L., Liu, L., Cheng, B., Zhou, F., Cao, D., & He, Y. (2022). A Comprehensive Review on the Benefits and Problems of Curcumin with Respect to Human Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(14), 4400. <https://doi.org/10.3390/molecules27144400>
- Liu, Y., Su, Z., Tavana, O., & Gu, W. (2024). Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression. *Cancer Cell*, 42(6), 946–967. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.04.009>
- Luo, F., Song, X., Zhang, Y., & Chu, Y. (2011). Low-dose curcumin leads to the inhibition of tumor growth via enhancing CTL-mediated antitumor immunity. *International Immunopharmacology*, 11(9), 1234–1240. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.002>
- Matsuo, Y. (2023). Natural Products and Cancer. *Nutrients*, 15(24), 5064. <https://doi.org/10.3390/nu15245064>



- Mishra, A., & Das, B. C. (2015). Curcumin as an anti-human papillomavirus and anti-cancer compound. *Future Oncology (London, England)*, *11*(18), 2487–2490. <https://doi.org/10.2217/fon.15.166>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270–278.  
<https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Patiño-Morales, C. C., Soto-Reyes, E., Arechaga-Ocampo, E., Ortiz-Sánchez, E., Antonio-Véjar, V., Pedraza-Chaverri, J., & García-Carrancá, A. (2020). Curcumin stabilizes p53 by interaction with NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in tumor-derived cell lines. *Redox Biology*, *28*, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101320>
- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnology Advances*, *32*(6), 1053–1064.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., & Ramirez-Tortosa, M. (2016). Curcumin and Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(3), 264.  
<https://doi.org/10.3390/molecules21030264>
- Rainey, N. E., Moustapha, A., & Petit, P. X. (2020). Curcumin, a Multifaceted Hormetic Agent, Mediates an Intricate Crosstalk between Mitochondrial Turnover, Autophagy, and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 3656419.  
<https://doi.org/10.1155/2020/3656419>
- Richardson, B. G., Jain, A. D., Speltz, T. E., & Moore, T. W. (2015). Non-electrophilic modulators of the canonical Keap1/Nrf2 pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *25*(11), 2261–2268. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.04.019>
- Schneider-Stock, R., & Ribatti, D. (2021). The CAM Assay as an Alternative In Vivo Model for Drug Testing. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *265*, 303–323.  
[https://doi.org/10.1007/164\\_2020\\_375](https://doi.org/10.1007/164_2020_375)
- Serafini, M. M., Catanzaro, M., Fagiani, F., Simoni, E., Caporaso, R., Dacrema, M., Romanoni, I., Govoni, S., Racchi, M., Daglia, M., Rosini, M., & Lanni, C. (2019). Modulation of Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway by Curcuma- and Garlic-Derived Hybrids. *Frontiers in*



*Pharmacology*, 10, 1597. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01597>

Slika, L., & Patra, D. (2020). A short review on chemical properties, stability and nano-technological advances for curcumin delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(1), 61–75.

<https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1702644>

Srivastava, S., Tong, Y. A., Devadas, K., Zou, Z. Q., Chen, Y., Pirollo, K. F., & Chang, E. H. (1992). The status of the p53 gene in human papilloma virus positive or negative cervical carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, 13(7), 1273–1275.

<https://doi.org/10.1093/carcin/13.7.1273>

Stefanson, A. L., & Bakovic, M. (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: Focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*, 6(9), 3777–3801.

<https://doi.org/10.3390/nu6093777>

Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysik, Z., & Espinosa, J. M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 133–143.

<https://doi.org/10.1038/cdd.2017.174>

Sullivan, K. D., Gallant-Behm, C. L., Henry, R. E., Fraikin, J.-L., & Espinosa, J. M. (2012). The p53 circuit board. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1825(2), 229–244.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.01.004>

Theodore, M., Kawai, Y., Yang, J., Kleshchenko, Y., Reddy, S. P., Villalta, F., & Arinze, I. J. (2008). Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8984–8994.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M709040200>

Yewdell, J. W., Lacsina, J. R., Rechsteiner, M. C., & Nicchitta, C. V. (2011). Out with the old, in with the new? Comparing methods for measuring protein degradation. *Cell Biology International*,

35(5), 457–462. <https://doi.org/10.1042/CBI20110055>

Yılmaz, S., Ülger, H., Ertekin, T., Yay, A. H., Nisari, M., Alpa, Ş., & Acer, N. (2019). Investigating the anti-tumoral effect of curcumin on the mice in which Ehrlich ascites and solid tumor is created. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(4), 418–425.

<https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.33623.8019>

Yuan, C., Fan, R., Zhu, K., Wang, Y., Xie, W., & Liang, Y. (2023). Curcumin induces ferroptosis and



apoptosis in osteosarcoma cells by regulating Nrf2/GPX4 signaling pathway. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 248(23), 2183–2197.

<https://doi.org/10.1177/15353702231220670>

